



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات درمانی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان:

ارزیابی تاثیر RNA interference بر روی بیان ژن های کالمودولین (Calmodulin)
و تتراسپانین (Tetraspanin) در مراحل مختلف تکاملی اکینوкокوس
گرانولوزوس در محیط برون تنی

توسط:

سید محمد موسوی

اساتید راهنما:

دکتر مجید فصیحی هرنندی، دکتر علی افگار

شماره پایان

سال

نامه: ۵۳۱

تحصیلی: تیر ۱۳۹۸

چکیده

مقدمه و اهداف: اکینوкокوس گرانولوزوس، عامل ایجاد اکینوкокوزیس کیستیک می باشد که اخیراً توسط سازمان جهانی بهداشت مورد توجه ویژه قرار گرفته است. این بیماری به عنوان يك اولویت بهداشت عمومی در انسان و در علفخواران و چهارپایان به عنوان عامل تحمیل کننده ضررهای اقتصادی شناخته می شود. عوامل تعیین کننده و مکانیزم های مولکولی پایه در تکامل اکینوкок و ارتباط آنها با میزبان تا حد زیادی ناشناخته است. توانایی انگل در شکل گیری فرم های متفاوت در میزبان واسط و نهایی و امکان رشد و تمایز انگل در شرایط آزمایشگاهی نیز قابل توجه است بگونه ای که پروتواسکولکس ها، کرم بالغ با سه یا بیش از سه بند و یا ساختارهای سیستمیک مشابه متاستود را شکل می دهند. کالمودولین (CaM) یک پروتئین متصل شونده به Ca^{2+} است که در بسیاری فعالیت های سلولی نقش دارد. همچنین خانواده تتراسپانین (TSP) یک پروتئین غشایی مهم است که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی یوکاریوت ها نقش دارند. در این مطالعه، تغییرات مولکولی و مرفولوژیکی ناشی از siRNA اختصاصی کالمودولین و dsRNA اختصاصی تتراسپانین ۱ در مراحل مختلف تکاملی اکینوкокوس گرانولوزوس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه پروتواسکولکس های کیست های هیداتید بدست آمده از کبد گوسفندان در محیط دو فازي جهت دست یابی به فرمهای تکاملی در مسیر بند زایی و در محیط مونوفازی جهت رسیدن به فرم میکروسیستی کشت داده شدند. سپس تداخل RNA ژن های مورد نظر با روش های مختلف ترانسفکشن (الکتروپوریشن، سوکینگ یا خپساندن و الکتروسوکینگ) بر روی مراحل مختلف انگل آزمایش شد و در ادامه بیان ژن ها و تغییرات فنوتیپی (ویابیلیتی، سایز انگل، اواژینه شدن پروتواسکولکس، حرکت انقباضی

کرم ها و تغییرات مرفولوژیکال (تگومنت) مراحل مختلف اکینوкокوس مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد siRNA اختصاصی کالمودولین باعث کاهش بیان ۶۵-۹۹ درصدی ژن کالمودولین در مراحل مختلف انگل اکینوкокوس نسبت به گروههای کنترل بدون تیمار و کنترل منفی siRNA می شود. همچنین سرکوب این ژن منجر به کاهش ویابیلیتی و متوقف کردن حرکت انقباضی کرم ها و تغییرات مرفولوژیک شد. در ادامه سرکوب بیان ژن تتراسپانین ۱ بوسیله ی dsRNA منجر به کاهش بیان این ژن، کاهش ویابیلیتی، کاهش حرکت کرم های بالغ و توقف بندزایی شد. همچنین مطالعات اولترا استراکچر بر روی این ژن نشان داد که سرکوب تتراسپانین ۱ باعث تغییرات گسترده در تگومنت کرم های بالغ می شود

نتیجه گیری: نقش و اهمیت ژن کالمودولین در رشد و تکامل و حرکت های انقباضی انگل قابل توجه است زیرا سرکوب بیان این ژن باعث تداخل در تکامل و حرکت انگل ها می شود. همچنین سرکوب تتراسپانین ۱ نشان داد که این ژن می تواند نقش بسزایی در تشکیل و تولید تگومنت داشته باشد. در نهایت این مطالعه نشان داد با استفاده از ابزار مداخله RNA می توان ژن های اساسی که برای تکامل انگل ها نقش دارند شناسایی و توسط این ژن ها کاندیدا های بالقوه ایی به عنوان دارو یا واکسن معرفی نمود.

dsRNA، siRNA کلمات کلیدی: اکینوкокوس گرانولوزوس، کرم بالغ، فرم لاروی، تتراسپانین، کالمودولین،

Abstract

Background and objectives: Cystic echinococcosis, caused by the cestode *Echinococcus granulosus*, is a neglected tropical disease that results in the mortality and humans as well as a problem of worldwide importance in livestock industry. The determinants and underlying molecular mechanisms of *Echinococcus* development in different host settings is largely unknown. The phenomenal bi-directional development of *E. granulosus* protoscoleces into multi-proglottid and/or microcysts, is a fascinating feature of the parasite cultivation. Calmodulin (CaM) is the major intracellular Ca^{2+} binding protein in plant and animal organisms. Tetraspanins (TSP) family of proteins are transmembrane proteins with a role in many physiological processes of eukaryotic organisms. In this study, we investigated the molecular and morphological changes induced by siRNA on EgCaM and dsRNA on EgTSP1 in different in vitro stages of *E. granulosus*.

Materials and methods: Three developmental stages of the tapeworm, protoscoleces, microcysts and strobilated worms, were cultivated in vitro in monophasic (DMEM or RPMI) and diphasic (CMRL1066) media and three

delivery methods, i.e. electroporation, soaking and electro-soaking, were used for RNA interference. The level of mRNA suppression as well as the phenotypic changes (viability, evagination, morphometric, contraction body, strobilization, morphology alteration and ultrastructural properties) of the parasites were measured.

Results: Following RNA interference, EgCaM mRNA suppressions of 65-99% were recorded in different stages of the tapeworm as compared to untreated / unrelated siRNA controls. Silencing expression of EgCaM in different stages of *E. granulosus* resulted in reduced viability and body contractions and morphological changes. After 3 days post-treatment, EgTSP1 expression was reduced significantly in all different stages of *E. granulosus* as compared to irrelevant/unrelated dsRNA and untreated controls. Silencing expression of EgTSP1 in different stages of *E. granulosus* resulted in reduced viability and body contractions, inhibition of protoscoleces evagination and distinctive tegumental changes. Ultrastructural morphology of the strobilated worms treated with EgTSP1-

specific dsRNA was indicative of the microtriches impairments and vacuolated tegument compared to the control helminths.

Conclusion: Lower viability, growth retardation, morphological abnormalities as well as EgCaM expression suppression were documented in the parasite implying potential of siRNA technology for the prevention and management of CE. Also, results of the present study suggest that EgTSP1 plays important structural role in tegument configuration in *E. granulosus*. EgTSP1 is proved to be a potential target for the development of vaccines and RNAi-based drugs.

Keywords: RNA interference; Calcium-binding protein; Protoscoleces; Microcysts; Strobilation; Echinococcosis;



Kerman University
of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Ph.D

Title:

**Evaluation and comparison of RNA interference effect on
Calmodulin and Tetraspanin genes expression in different
developmental stages of Echinococcus granulosus in vitro**

By:

Seyed Mohammad Mousavi

Supervisor\':

1-Prof. Majid Fasihi Harandi 2-Dr. Ali Afgar

Thesis No: 531

Data: (July,2019)



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

بسمه تعالی

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

تاریخ ۹۸/۴/۲۴.....

شماره ۹۸/۳/۵۲۱.....

پیوست.....

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای سید محمد موسوی دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته انگل شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان "ارزیابی تأثیر RNA interference بر روی بیان ژن های کالمودولین (Calmodulin) و تتراسپانین (Tetraspanin) در مراحل مختلف تکاملی اکتینوکوکوس گرانولوزوس در محیط برون تنی" در ساعت ۱۰ صبح روز دوشنبه مورخ ۹۸/۴/۲۴ با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استادان راهنما	جناب آقای دکتر مجید فصیحی هرندي جناب آقای دکتر علی افگار	
ب: استادان مشاور	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر ناصر ضیاعلی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر حسین فلاح	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر بهرام کاظمی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر پویا قاسمی نژاد	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۲۰/۰۰ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

